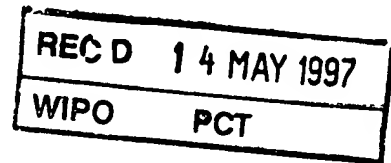


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY DOCUMENT****Bescheinigung**

Die Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH in Heidelberg/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen
zwischen Proteinen"

am 7. März 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklas-
sifikation erhalten.

München, den 26. März 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Aktenzeichen: 196 08 813.5

Mackus

Anmelder: Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH
"Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen"
Unser Zeichen: A 2949 - hu / wd

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, daß sich zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen eignet, eine ein solches Konjugat kodierende DNA und die Verwendung des Konjugats.

Viele Vorgänge in einem Organismus beruhen auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Beispiele solcher Wechselwirkungen finden sich bei Rezeptoren und den an sie bindenden Liganden. Oftmals sind allerdings die Wechselwirkungen zwischen Proteinen gestört. Dies kann daran liegen, daß einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine modifiziert sind, wodurch ihre Affinität zu anderen, ebenfalls beteiligten Proteinen verändert ist. Auch können einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine fehlen. Dies findet man z.B. bei Zellen, die nicht auf Interleukin-6 (IL-6) reagieren. Solche Zellen weisen einen unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor auf, d. h. dieser Rezeptor umfaßt lediglich die intrazelluläre, Signal-auslösende Untereinheit gp130, nicht aber die extrazelluläre, IL-6 bindende Untereinheit (IL-6R).

Viele Versuche werden unternommen, gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beheben. Beispielsweise wird dies bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor durch Verabreichung von IL-6 (50 ng/ml) und löslichem IL-6R (sIL-6R) (1280 ng/ml) versucht. Die Bereitstellung von sIL-6R bedingt jedoch einen großen Kosten- und Zeitaufwand, da sIL-6R nur biologisch aktiv ist, wenn es aus eukaryotischen Zellen stammt, und die Erträge aus solchen im Bereich von 1-6 mg sIL-6R/l liegen. Die genannte Verabreichung stellt somit kein geeignetes Mittel dar, dauerhaft die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor zu beheben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen, insbesondere bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor, behoben werden können.

- 2 -

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide" betrifft Polypeptide jeglicher Art und Länge, die eine Affinität zueinander aufweisen. Zwei solcher Polypeptide liegen in einem erfindungsgemäßen Konjugat vor. Eines dieser Polypeptide kann ein Rezeptor und das andere ein an den Rezeptor bindender Ligand sein. Der Rezeptor kann in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Liganden binden. Ebenso kann der Ligand in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Rezeptor binden. Vorzugsweise ist der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor, insbesondere ein Rezeptor für Lymphokine, Monokine, Interferone, "colony stimulating factors" oder Interleukine. Besonders bevorzugt ist der Rezeptor ein Interleukin-6-Rezeptor oder ein CNTF-Rezeptor. Entsprechendes gilt für den Liganden. Dieser ist vorzugsweise ein Zytokin, insbesondere ein Lymphokin, Monokin, Interferon, "colony stimulating factor" oder Interleukin. Besonders bevorzugt ist der Ligand ein Mitglied der Interleukin-6-Familie, insbesondere IL-6, IL-11, CNTF, OSM, LIF oder CT-1.

Der Ausdruck "Linker" betrifft Linker jeglicher Art, die sich zur Verbindung von Polypeptiden eignen. Beispiele solcher Linker sind bifunktionelle, chemische Cross-Linker, z.B. DPDPB. Ferner kann der Linker eine durch die beiden Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke sein. Desweiteren kann der Linker ein Polypeptid sein.

In bevorzugter Ausführungsform ist ein vorstehendes Konjugat ein Fusionspolypeptid. In diesem können die zwei, eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide miteinander fusioniert sein und der Linker einer durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke darstellen. Vorzugsweise ist der Linker

ein Polypeptid, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet. Ein Beispiel letzteren Fusionspolypeptids ist in Fig. 1 angegeben. Dieses Fusionspolypeptid umfaßt ein humanes sIL-6R-Polypeptid, d.h. die extrazelluläre Untereinheit eines Interleukin-6-Rezeptors, und ein humanes IL-6-Polypeptid, wobei die Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Dieses Fusionspolypeptid wird mit H-IL-6 bezeichnet. Eine Variation von H-IL-6, die von dem sIL-6R-Polypeptid nur die Aminosäuren Pro 114 bis Ala 323 enthält, wird ebenfalls bereitgestellt. Ferner wird ein Fusionspolypeptid bereitgestellt, das die extrazelluläre Untereinheit eines humanen CNTF-Rezeptors und humanes CNTF umfaßt, wobei beide Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein vorstehendes Fusionspolypeptid kodierende DNA. Vorzugsweise kodiert die DNA für ein Fusionspolypeptid, bei dem die zwei, eine Affinität zueinander aufweisenden Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Ein Beispiel letzterer DNA ist in Fig. 1 angegeben. Diese DNA wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als CDM8-H-IL-6 unter DSM 10549 am 27. 2. 1996 hinterlegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100, Ycpad1 und Vektoren für *Pichia pastoris* zu nennen, wobei letztere bevorzugt sind, während für die Expression in tierischen Zellen, die in einem Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen können, z.B. pKCR, pEFBOS, pCEV4 und pCDM8 angegeben sind, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A. Der Fachmann wird berücksichtigen, daß für die Expression einer erfindungsgemäßen, sIL-6R-Sequenzen enthaltenden, DNA Vektoren angeraten sind, die eine Expression in eukaryotischen Zellen ermöglichen.

- 4 -

Ferner kennt der Fachmann geeignete Zellen, um eine erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, wobei letzterer bevorzugt ist, die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, Vero, HeLa und COS, wobei letztere bevorzugt sind, sowie die Insektenzellen sf9.

Desweiteren weiß der Fachmann, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Auch kennt er Bedingungen, Zellen zu transformieren bzw. transfizieren und diese dann zu kultivieren. Darüberhinaus sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Fusionspolypeptid zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Fusionspolypeptid gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden Fusionspolypeptid zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen Fusionspolypeptid erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen. Dies kann durch die Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate wie auch durch den Einsatz erfindungsgemäßer DNA in einer Gentherapie erfolgen. Insbesondere können die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor behoben werden. Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß sie kostengünstig eingesetzt werden kann. Dies zeigt sich insbesondere in der Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate zur Beeinflussung der gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor.

Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung zur ex vivo Expansion von Stammzellen, insbesondere humanen Stammzellen. Besonders bemerkenswert ist es dabei, daß mit einem erfindungsgemäßen Konjugat, H-IL-6, mehr Stammzell-Kolonien im Soft-Agar erhalten werden, als dies mit den einzelnen Komponenten IL-6 und sIL-6R möglich ist. Die vorliegende Erfindung stellt somit auch einen wichtigen Beitrag dar, gezielt in die Bildung von Blutzellen einzugreifen.

Die Durchführung der vorliegenden Erfindung kann durch die erfindungsgemäßen Antikörper überwacht werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Fig. 1 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGSGGGGSGGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH₂-Terminus von humanem IL-6.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA

Es wurde humane IL-6R cDNA (Schooltink et al., Biochem. J. (1991) 277, 659-664) verwendet. Diese cDNA wurde in das Expressionsplasmid pCDM8 über die Restriktionsstelle Xho I einkloniert (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480). Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter Verwendung der Primer (1) (pCDM8 5' Primer: 5' TAATACGA \overline{C} CTCACTATAGGG3') und Primer (2) (sIL-6R 3' Primer: 5'CCGCTCGAGCTGGAGGACTCCTGGA 3') bei Standardbedingungen ein sIL-6R Fragment generiert, das nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I in das geöffnete Plasmid pCDM8 einkloniert wurde. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R. Anschließend wurde

- 6 -

eine zweite PCR Reaktion mit IL-6 cDNA, die ebenfalls in das Expressionsplasmid pCDM8 unter Verwendung von Xho I einkloniert worden war, durchgeführt.

Es wurden die Primer (3) (IL-6-5' Primer: 5' CGGCTCGAGCCAGTACCCCCAGGAGAA3') und Primer (4) (pCDM8 3' Primer: 5'CCACAGAAGTAAGGTTCTT3') verwendet. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Xho I und Not I geschnitten und in das Plasmid pCDM8-sIL-6R einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6. Anschließend wurde ein synthetischer Linker hergestellt, der aus zwei Oligonukleotiden bestand: Primer(5) (5'TCGAGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTGG3') und Primer (6) (5'TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCC3'. Die Oligonukleotide (5) und (6) wurden nach Standardmethoden zu einem Doppelstrang zusammengefügt und anschließend in das mit dem Restriktionsenzym Xho I verdaute Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6 einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-H-IL-6.

Beispiel 2: Expression eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids

COS-7-Zellen wurden mit pCDM8-H-IL-6 von Beispiel 1 mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Es wurden 10^7 COS-7 Zellen mit $20\mu\text{g}$ Plasmid mit Hilfe eines Gene-Pulsers (Bio-Rad) bei $960\mu\text{F}$ und 230 V elektroporiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen metabolisch mit [^{35}S]-Cystein/Methionin 4 h radioaktiv markiert und 2 h mit nicht radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Der Überstand aus Zellysat und Zellüberstand wurde nach Standardmethoden (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480) mit einem anti-IL-6 Antikörper immunpräzipitiert und nach SDS-Gelelektrophorese durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Transfizierte COS-7 Zellen sezernierten ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt und nicht von untransfizierten Zellen gebildet wurde.

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem anti-IL-6 Antikörper detektiert. Wiederum exprimierten transfizierte COS-7 Zellen ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt wurde.

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden mit Hilfe eines kommerziellen ELISA auf IL-6 (CLB, Amsterdam) und sIL-6R (Seromed, Gießen) untersucht. Mit beiden ELISAs wurde H-IL-6 detektiert. Die Konzentration von H-IL-6 im Zellüberstand betrug etwa 1 µg/ml.

5

Beispiel 3: Stimulation der Haptoglobin-Expression durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid

10

Es wurden die humanen Hepatomazelllinien HepG2, HepG2-IL-6 und HepG2-PDI verwendet.

HepG2 Zellen (ATCC HB 8065) werden durch IL-6, nicht aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

15

HepG2-IL-6 Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Diese Zellen regulieren aufgrund der IL-6 Expression endogenes IL-6R herunter und exprimieren somit kein IL-6R. HepG2-IL-6 Zellen werden nicht durch IL-6, aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

20

HepG2-PDI Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Hierzu wies das Expressionsplasmid eine IL-6 cDNA auf, durch die das exprimierte IL-6 Protein ein COOH-terminales Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER) enthielt.

25

Daraus resultierte, daß diese Zellen nicht durch das exprimierte IL-6, sondern auch IL-6R im ER zurückhielten. Im Gegensatz zu HepG2-IL-6 Zellen sezernieren aber HepG2-PDI Zellen kein IL-6 und können nur durch die Kombination von IL-6 und sIL-6R stimuliert werden, Haptoglobin zu exprimieren.

30

Die vorstehenden Hepatomazelllinien wurden nach Standardbedingungen in 96er Zellkulturplatten kultiviert (Rose-John et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 22084-22091). Die Zellen wurden mit IL-6, sIL-6R, IL-6 + sIL-6R bzw. Zellüberständen aus mit pCDM8-H-IL-6 bzw. pCDM8 transfizierten COS-7 Zellen von Beispiel 2

- 8 -

18 h stimuliert. Der Zellüberstand wurde geerntet und die Haptoglobinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt (vgl. Tabelle I).

5

Tabelle I

Stimulation der Haptoglobin-Expression

		IL-6	sIL-6R	IL-6 + sIL-6R	H-IL-6	Kontrolle
10	HepG2	+	-	++	+++	-
	HepG2-IL-6	-	++	++	+++	-
	HepG2-PDI	-	-	++	+++	-

15

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid, H-IL-6, in der Lage ist, die Expression von Haptoglobin in Zellen zu stimulieren, d.h. die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen.

Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.
- 5 2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das eine Polypeptid ein Rezeptor und das andere ein den Rezeptor bindender Ligand ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
- 10 4. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor und der Ligand ein Zytokin ist.
- 15 6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
- 20 7. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke ist.
- 25 9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein bifunktionseller, chemischer Cross-Linker ist.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß

- 2 -

das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.

11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein Polypeptid ist, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet.

5

12. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 10 oder 11.

13. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 12.

10

14. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 13.

15. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 - 11 und der DNA nach Anspruch 12 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

15

Zusammenfassung

5 Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Protei-

10 nen.

1	GTCGACGCATGGAGTGGTAGCCCGAGGAGGAAGC	ATG	CTG	GCC	GTC	GGC	TGC	GCG	CTG	CTG	GCT	63									
1		M	L	A	V	G	C	A	L	L	A	10									
64	GCC	CTG	CTG	GCC	GCG	CCG	GGA	GCG	GCG	CTG	GCC	CCA	AGG	CGC	TGC	CCT	GCG	CAG	GAG	GTG	123
11	A	L	L	A	A	P	G	A	A	L	A	P	R	R	C	P	A	Q	E	V	30
124	GCA	AGA	GGC	GTG	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA	GGA	GAC	AGC	GTG	ACT	CTG	ACC	TGC	CCG	GGG	GTA	183
31	A	R	G	V	L	T	S	L	P	G	D	S	V	T	L	T	C	P	G	V	50
184	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT	GCC	ACT	GTT	CAC	TGG	GTG	CTC	AGG	AAG	CCG	GCT	GCA	GGC	TCC	CAC	243
51	E	P	E	D	N	A	T	V	H	W	V	L	R	K	P	A	A	G	S	H	70
244	CCC	AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	AGG	CTG	CTG	CTG	AGG	TGC	GTG	CAG	CTC	CAC	GAC	303
71	P	S	R	W	A	G	M	G	R	R	L	L	L	R	S	V	Q	L	H	D	90
304	TCT	GGA	AAC	TAT	TCA	TGC	TAC	CGG	GCC	GGC	CGC	CCA	GCT	GGG	ACT	GTG	CAC	TTG	CTG	GTG	363
91	S	G	N	Y	S	C	Y	R	A	G	R	P	A	G	T	V	H	L	L	V	110
364	GAT	GTT	CCC	CCC	GAG	GAG	CCC	CAG	CTC	TCC	TGC	TTC	CGG	AAG	AGC	CCC	CTC	AGC	AAT	GTT	423
111	D	V	P	P	E	E	P	Q	L	S	C	F	R	K	S	P	L	S	N	V	130
424	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT	CCT	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA	AAG	GCT	GTG	CTC	TTG	GTG	483
131	V	C	E	W	G	P	R	S	T	P	S	L	T	T	K	A	V	L	L	V	150
484	AGG	AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC	TTC	CAG	GAG	CCG	TGC	CAG	TAT	TCC	CAG	GAG	543
151	R	K	F	Q	N	S	P	A	E	D	F	Q	E	P	C	Q	Y	S	Q	E	170
544	TCC	CAG	AAG	TTC	TCC	TGC	CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GGA	GAC	AGC	TCT	TTC	TAC	ATA	GTG	603
171	S	Q	K	F	S	C	Q	L	A	V	P	E	G	D	S	S	F	Y	I	V	190
604	TCC	ATG	TGC	GTC	GCC	AGT	AGT	GTC	GGG	AGC	AAG	TTC	AGC	AAA	ACT	CAA	ACC	TTT	CAG	GGT	663
191	S	M	C	V	A	S	S	V	G	S	K	F	S	K	T	Q	T	F	Q	G	210
664	TGT	GGA	ATC	TTG	CAG	CCT	GAT	CCG	CCT	GCC	AAC	ATC	ACA	GTC	ACT	GCC	GTG	GCC	AGA	AAC	723
211	C	G	I	L	Q	P	D	P	P	A	N	I	T	V	T	A	V	A	R	N	230
724	CCC	CGC	TGG	CTC	AGT	GTC	ACC	TGG	CAA	GAC	CCC	CAC	TCC	TGG	AAC	TCA	TCT	TTC	TAC	AGA	783
231	P	R	W	L	S	V	T	W	Q	D	P	H	S	W	N	S	S	F	Y	R	250
784	CTA	CGG	TTT	GAG	CTC	AGA	TAT	CGG	GCT	GAA	CGG	TCA	AAG	ACA	TTC	ACA	ACA	TGG	ATG	GTC	843
251	L	R	F	E	L	R	Y	R	A	E	R	S	K	T	F	T	T	W	M	V	270
844	AAG	GAC	CTC	CAG	CAT	CAC	TGT	GTC	ATC	CAC	GAC	GCC	TGG	AGC	GGC	CTG	AGG	CAC	GTG	GTG	903
271	K	D	L	Q	H	H	C	V	I	H	D	A	W	S	G	L	R	H	V	V	290
904	CAG	CTT	CGT	GCC	CAG	GAG	GAG	TTC	GGG	CAA	GGC	GAG	TGG	AGC	GAG	TGG	AGC	CCG	GAG	GCC	963
291	Q	L	R	A	Q	E	E	F	G	Q	G	E	W	S	E	W	S	P	E	A	310
964	ATG	GGC	ACG	CCT	TGG	ACA	GAA	TCC	AGG	AGT	CCT	CCA	GCT	CGA	GGA	GGT	GGA	GGT	TCT	GGA	1023
311	M	G	T	P	W	T	E	S	R	S	P	P	A	R	G	G	G	G	S	G	330
1024	GGT	GGA	GGT	TCT	GGA	GGT	GGA	GGT	TCT	GTC	GAG	CCA	GTA	CCC	CCA	GGA	GAA	GAT	TCC	AAA	1083
331	G	G	G	S	G	G	G	G	S	V	E	P	V	P	P	G	E	D	S	K	350
1084	GAT	GTA	GCC	GCC	CCA	CAC	AGA	CAG	CCA	CTC	ACC	TCT	TCA	GAA	CGA	ATT	GAC	AAA	CAA	ATT	1143
351	D	V	A	A	P	H	R	Q	P	L	T	S	S	E	R	I	D	K	Q	I	370
1144	CGG	TAC	ATC	CTC	GAC	GGC	ATC	TCA	GCC	CTG	AGA	AAG	GAG	ACA	TGT	AAC	AAG	AGT	AAC	ATG	1203
371	R	Y	I	L	D	G	I	S	A	L	R	K	E	T	C	N	K	S	N	M	390
1204	TGT	GAA	AGC	AGC	AAA	GAG	GCA	CTG	GCA	GAA	AAC	AAC	CTG	AAC	CTT	CCA	AAG	ATG	GCT	GAA	1263
391	C	E	S	S	K	E	A	L	A	E	N	N	L	N	L	P	K	M	A	E	410
1264	AAA	GAT	GGA	TGC	TTC	CAA	TCT	GGA	TTC	AAT	GAG	GAG	ACT	TGC	CTG	GTG	AAA	ATC	ATC	ACT	1323
411	K	D	G	C	F	Q	S	G	F	N	E	E	T	C	L	V	K	I	I	T	430
1324	GGT	CTT	TTG	GAG	TTT	GAG	GTA	TAC	CTA	GAG	TAC	CTC	CAG	AAC	AGA	TTT	GAG	AGT	AGT	GAG	1383
431	G	L	L	E	F	E	V	Y	L	E	Y	L	Q	N	R	F	E	S	S	E	450
1384	GAA	CAA	GCC	AGA	GCT	GTG	CAG	ATG	AGT	ACA	AAA	GTC	CTG	ATC	CAG	TTC	CTG	CAG	AAA	AAG	1443
451	E	Q	A	R	A	V	Q	M	S	T	K	V	L	I	Q	F	L	Q	K	K	470
1444	GCA	AAG	AAT	CTA	GAT	GCA	ATA	ACC	ACC	CCT	GAC	CCA	ACC	ACA	AAT	GCC	AGC	CTG	CTG	ACG	1503
471	A	K	N	L	D	A	I	T	T	P	D	P	T	T	N	A	S	L	L	T	490
1504	AAG	CTG	CAG	GCA	CAG	AAC	CAG	TGG	CTG	CAG	GAC	ATG	ACA	ACT	CAT	CTC	ATT	CTG	CGC	AGC	1563
491	K	L	Q	A	Q	N	Q	W	L	Q	D	M	T	T	H	L	I	L	R	S	510
1564	TTT	AAG	GAG	TTC	CTG	CAG	TCC	AGC	CTG	AGG	GCT	CTT	CGG	CAA	ATG	TAG	CATGGGGCACCCTGGAC				1627
511	F	K	E	F	L	Q	S	S	L	R	A	L	R	Q	M						525

FIG. 1